

F  
PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 7/08, 1/107, A61K 38/10</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/27110</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>25. Juni 1998 (25.06.98)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP97/07090</b>		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>17. Dezember 1997 (17.12.97)</b>		Veröffentlicht <i>Ohne internationales Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: <b>196 52 586.1 17. Dezember 1996 (17.12.96) DE</b>			
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): <b>GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</b>			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): <b>MÜHLRADT, Peter, F. [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).</b>			
(74) Anwälte: <b>BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters &amp; Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</b>			

(54) Title: DIHYDROXYPROPYL CYSTEINE PEPTIDE AND AGENT CONTAINING THIS PEPTIDE

(54) Bezeichnung: DHC-PEPTID UND DIESES ENTHALTENDES MITTEL

(57) Abstract

The invention relates to an S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteine peptide with two long-chain fatty acids connected in ester fashion to the dihydroxypropyl group and the following sequence: DhcGN NDE SNI SFK EK. The invention relates furthermore to an agent containing a certain quantity of the afore-mentioned peptide.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid mit zwei esterartig gebundenen langkettigen Fettsäuren an der Dihydroxypropylgruppe und der folgenden Sequenz: DhcGN NDE SNI SFK EK. Die Erfindung betrifft ferner ein Mittel mit einem Gehalt an dem genannten Peptid.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	R	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## DHC-PEPTID UND DIESES ENTHALTENDES MITTEL

Die makrophagenstimulierende Wirkung von Mykoplasmen ist seit längerer Zeit bekannt; vgl. Loewenstein et al. in *Cellular Immunology*, 77 (1983) 290-297. Es ist auch vermutet und formal bewiesen worden, daß Lipoproteine aus Mykoplasmen eine derartige Wirkung zeigen; vgl. Herbelin et al. in *Infect. Immun.*, 62 (1994) 4690-4694 und Mühlradt et al. in *Biochemistry*, 35 (1996) 7781-7786. Lipoproteine aus Gram-negativen Bakterien und Analoga dieser Lipoproteine sind ebenfalls Immunmodulatoren und speziell als Makrophagenaktivatoren beschrieben worden; vgl. Melchers et al. in *J. Exp. Med.*, 142 (1975) 473-482 und Hoffmann et al. in *Immunobiol.*, 177 (1988) 158-170. Diese Spezies von Lipoproteinen tragen N-terminal eine S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-Gruppe (Dhc) mit drei langkettigen Fettsäuren, von denen zwei esterartig und eine amidartig gebunden ist.

Lipoproteine und synthetische Lipopeptidanaloga zeigen eine halbmaximale Wirkkonzentration (Max/2) von etwa  $10^{-7}$  M; vgl. Melchers et al. in *J. Exp. Med.*, 142 (1975) 473-482 und Hoffmann et al. in *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 370 (1989) 575-582.

- 2 -

Synthetische Analoga ohne die Amidfettsäure zeigen eine halbmaximale Wirkkonzentration (Max/2) von etwa  $10^{-8}$  M; vgl. Metzger et al. in J. Peptide Scie., 3 (1995) 184-190. Ferner hat Baschang in Tetrahedron, 45 (1989) 6331-6360, 6352 ein mit Taurin modifiziertes Lipopeptid (Na-Sulfonat; CGP-31 362) beschrieben, das nach Dong et al. in J. Exp. Med., 177 (1993) 1071-1077 noch bei 1 bis 10 ng/ml bzw. 1 bis  $10 \times 10^{-9}$  M makrophagenaktivierend ist. Schließlich beschreiben Metzger et al. in J. Peptide Scie., 3 (1995) 184-190 ein Dhc-Peptid mit der Aminosäuresequenz CFE PPP ATT T, wobei an die 2,3-Dihydroxypropylgruppe zwei Palmitoylgruppen gebunden sind. Die halbmaximale Wirkkonzentration (Max/2) dieses bekannten Peptids beträgt 16 ng/ml bzw.  $10 \times 10^{-9}$  M.

Es besteht jedoch weiterhin ein Bedürfnis nach wirksamen Lipopeptiden.

Erfindungsgemäß wird nun ein S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cysteinpeptid mit zwei esterartig an die Dehydroxypropylgruppe gebundenen Fettsäuren, die gleich oder verschieden sein können, vorgeschlagen, wobei das Peptid die folgende Aminosäuresequenz (I):

DhcGN NDE SNI SFK EK (I) bzw.  
Dhcys Gly Asn Asn Asp Gln Ser Asn Ile Ser Phe Lys  
Gln Lys

oder eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit der Sequenz (I) mit der Ausnahme identisch ist, das N-terminal die 2 Aminosäuren an Positionen 2 und gegebenenfalls 3 fehlen und/oder C-terminal 1 bis 2 Aminosäuren deletiert sind.

Erfindungsgemäß können die beiden Fettsäurereste die Formel R-CO- besitzen, wobei R in C<sub>7-25</sub>-Alkyl-, C<sub>7-25</sub>-Alkenyl- oder C<sub>7-25</sub>-Akinyrest ist, wobei ungesättigte Reste vorzugsweise in cis-

- 3 -

Konfiguration vorliegen. Beispiel für C<sub>7-25</sub>-Alkyl-, Alkenyl- und Alkinylreste sind C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-Reste.

Erfindungsgemäß wird ferner ein Mittel mit einem Gehalt an einem S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid gemäß der Erfindung mit einem üblichen Träger und/oder Hilfsmittel vorgesehen. Das erfindungsgemäße Mittel kann zur Stimulierung der Antikörper-Synthese, zur Vorbeugung gegen Infektionen (anti-infective activity), als Immunostimulanz gegen Tumoren, zur Aktivierung von Makrophagen, zur Ausbildung von Toleranz gegenüber Endotoxin bzw. bei septischem Schock, insbesondere bei Gram-negativen Bakterien oder als Vakzin-Adjuvanz (Beimischung zu einem Vakzin) verwendet werden.

Erfindungsgemäß lassen sich S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptide vollsynthetisch herstellen. Der Fachmann kann dabei in Analogie zum angeführten Stand der Technik vorgehen. Verwiesen sei auch auf die DE 35 46 150 A1, DE 37 00 173 A1, DE 38 13 821 A1, DE 41 19 856 A1 und DE 43 29 309 A1.

Nachstehend wird die Erfindung an einem Beispiel näher erläutert.

#### Beispiel

Das Lipopeptid wird aus *Mycoplasma fermentans* (beispielsweise PG18) präpariert. Die Isolierung des Lipopeptids aus Mykoplasmen erfolgt durch den folgenden bekannten Trennungsgang (Mühlradt et al. in Biochemistry, 35 (1996) 7781-7786).

- (i) Die Delipidierung der Mykoplasmen mit Chloroform/Methanol.
- (ii) Extraktion der delipidierten Mykoplasmen mit heißem 25 mM Octylglucosid.
- (iii) Dialyse dieses Detergens-Extraktes.
- (iv) Konzentrieren des Extraktes durch Gefriertrocknung.

- 4 -

(v) Umkehrphasen-Chromatographie auf einer C8-Säule mit einem Wasser/2-Propanol-Gradienten.

Die Detektion der biologischen Aktivität erfolgt, indem man Nitrit und Nitrat als Folgeprodukte von Stickstoffmonoxid mißt, das bei Stimulation von interferonbehandelten murinen Peritonealmakrophagen freigesetzt wird.

Der Wirkstoff ist ein S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid mit zwei esterartig gebundenen langkettigen Fettsäuren (C16:0 und C18:0/C18:1) an der Dihydroxypropylgruppe und mit der folgenden Sequenz:

Dhc-GNN DES NIS FKE K. Das häufigste Molekulargewicht beträgt 2164. Daneben können Varianten ermittelt werden, die sich durch unterschiedliche Fettsäuren und durch ein um zwei Aminosäuren C-terminal verkürztes Peptid auszeichnen.

Die Substanz besitzt die Eigenschaft, Makrophagen von Mäusen und Menschen zur Freisetzung von Zytokinen und Prostaglandinen zu stimulieren, und zwar mit allen Konsequenzen der indirekten Stimulation von T- und B-Lymphozyten; vgl. Mühlradt et al. in Infect. Immun., 59 (1991) 3962-3968 und Feng & Lo in Infect. Immun., 62 (1994) 3916-3921. Ihre halbmaximale Wirkkonzentration (Max/2) beträgt 20 pg/ml bzw.  $10^{-11}$  M im Maussystem. Diese Wirkkonzentration ist um den Faktor  $10^2$  bis  $10^3$  geringer als die entsprechenden bekannten Konzentrationen ähnlicher natürlicher oder synthetischer Lipopeptide.

**Patentansprüche**

1. S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid mit zwei esterartig an die Dihydroxypropylgruppe gebundenen Fettsäuren, die gleich oder verschieden sein können, wobei das Peptid die folgende Aminosäuresequenz (I):

DhcGN NDE SNI SFK EK

oder eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit der Sequenz (I) mit der Ausnahme identisch ist, daß N-terminal die Aminosäuren an Positionen 2 und gegebenenfalls 3 fehlen und/oder C-terminal 1 bis 2 Aminosäuren deletiert sind.

2. S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Fettsäurereste die Formel R-CO- besitzen, wobei R eine C<sub>7-25</sub>-Alkyl-, C<sub>7-25</sub>-Alkenyl- oder

- 6 -

C<sub>7-25</sub>-Alkinylgruppe ist, wobei ungesättigte Reste vorzugsweise in cis-Konfiguration vorliegen.

3. Mittel mit einem Gehalt an einem S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 neben einem üblichen Träger und/oder Hilfsmittel.

4. Mittel nach Anspruch 3 zur Stimulierung der Antikörper-Synthese.

5. Mittel nach Anspruch 3 zur Vorbeugung gegen Infektionen (anti-infective activity).

6. Mittel nach Anspruch 3 zur Immunostimulanz gegen Tumoren.

7. Mittel nach Anspruch 3 zur Aktivierung von Makrophagen.

8. Mittel nach Anspruch 3 zur Ausbildung von Toleranz gegenüber Endotoxinen (septischer Schock), insbesondere bei Gram-negativen Bakterien.

9. Mittel nach Anspruch 3 als Vakzin-Adjuvanz (Beimischung zu einem Vakzin).

10. Mittel nach Anspruch 3 für kurzfristigen Schutz vor Infektionen, insbesondere Crowding Disease, bei Tieren, insbesondere Vieh, Nutz- oder Haustieren.